UNIVERSITE PARIS VI
FACULTE PITIE SALPETRIERE

ANNEE 1975

2 N° 43

THESE

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

Par Marie-Annick TRAVERS née TOULOUSE
le 31 Août 1948 à Fourmies (NORD)

TITRE: ETUDE COMPARATIVE DE LIPIDOGRAMMES OBTENUS SUR PAPIER, CELLOGEL et AGAROSE

Président de Thèse: Monsieur J. LOEPER (Professeur)

UNIVERSITE PARIS VI
FACULTE PITIE SALPETRIERE

ANNEE 1975 N°

THESE

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

Par Marie-Annick TRAVERS née TOULOUSE
le 31 Août 1948 à Fourmies (NORD)

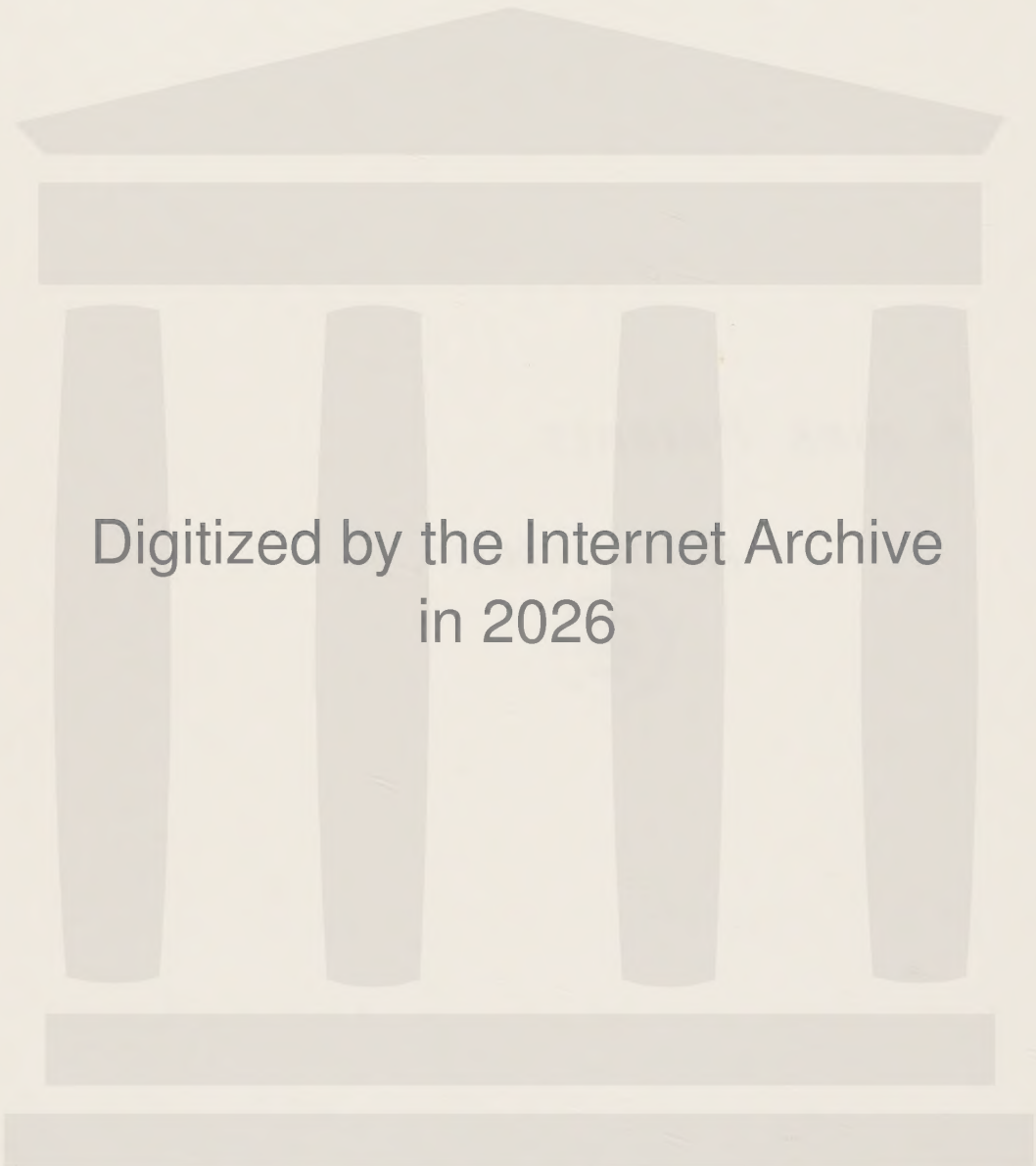
TITRE: ETUDE COMPARATIVE DE LIPIDOGRAMMES OBTENUS SUR PAPIER, CELLOGEL et AGAROSE

Président de Thèse: Monsieur J. LOEPER (Professeur)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes Parents,

A ma sœur.


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548124_0039

A mon Mari

A mon Maître

Monsieur le Professeur J. LOEPER

Médecin de l'Hôpital de la Salpêtrière

Professeur de Médecine Expérimentale

au C.H.U. Saint-Antoine

Qui m'a permis d'effectuer ce travail en m'accueillant avec bienveillance dans son Laboratoire et m'a fait le très grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Qu'il me soit permis de lui témoigner toute ma reconnaissance.

A mes maîtres de stages hospitaliers :

Professeur BOUDIN

Professeur LEBEAU

Professeur SCHERRER

Professeur DUCHE

Professeur LOEPER

Je tiens tout particulièrement à remercier

Mademoiselle J. LOEPER

qui a bien voulu m'aider dans la réalisation de ce travail.

INTRODUCTION

C'est en raison de l'intérêt de l'étude des lipoprotéines plasmatiques en tant que facteurs essentiels de la pathogénie de l'athérosclérose et des maladies lipidiques héréditaires que des méthodes assez simples de séparation des lipoprotéines sériques ont été mises au point.

En effet, en 1941, Blix et Tiselius séparèrent, au moyen de l'électrophorèse libre, deux groupes essentiels : les alpha et les bêta lipoprotéines.

Actuellement, de nombreuses méthodes de fractionnement permettent d'isoler ces lipoprotéines.

La technique du lipoprotéinogramme sur papier fut établie vers les années 1950 d'après la méthode de Grassman. Dans un tampon véronal classique, trois fractions principales furent identifiées : les alphalipoprotéines, les bêta-lipoprotéines et une troisième fraction ou "traînée" qui commence au niveau de la branche descendante des bêtalipoprotéines et s'étend jusqu'au point de départ des lipoprotéinogrammes et principalement constituée par des chylomicrons.

En 1963, Lees et Hatch ajoutèrent de l'albumine à la solution tampon. Grâce à cette modification qui diminue l'adsorption des protéines sur le papier, ils purent avec précision individualiser quatre groupes : les chylomicrons au point de départ ; les bêtalipoprotéines, les prébêtalipoprotéines et les alpha-lipoprotéines.

C'est cette technique que Frédrickson et Lees utilisèrent en 1967 pour faire une classification des hyperlipoprotéinémies rencontrées en clinique humaine.

Mais au support de papier était reproché son pouvoir adsorbant vis à vis des protéines et son faible pouvoir discriminatif. D'autres supports furent recherchés.

En 1968, R.P. Noble mit au point une méthode de séparation des lipoprotéines sériques au moyen de l'électrophorèse sur gel d'agarose. Cette méthode, assez longue et délicate permet une meilleure séparation des bêta et des prébêtalipoprotéines.

En 1969, une microméthode d'électrophorèse sur acétate de cellulose gélatineux fut établie dans le laboratoire central de chimie de l'Hôpital de Nancy, méthode permettant d'effectuer des lipoprotéinogrammes en grande quantité.

Enfin, d'autres techniques que nous n'étudierons pas ici existent ; parmi celles-ci, citons-l'électrophorèse en bloc d'amidon (technique de Smithies), où l'adsorption des protéines sur l'amidon en poudre est moins forte que sur support de papier.

-des électrophorèses en gel de polyacrilamide ou en gel mixte : polyacrylamide + agarose (Uriel) sont réalisées ; ces gels, provoquant un effet de tamisage moléculaire, permettent d'obtenir une résolution très fine.

Au cours de cette étude, nous nous proposons de comparer les lipoprotéinogrammes fournis par trois méthodes d'électrophorèse des lipoprotéines plasmatiques afin de connaître les qualités respectives de chacune et de savoir si l'une est supérieure à l'autre pour le diagnostic.

Dans ce but, 150 sérums ont été soumis à l'électrophorèse des lipides sur papier, cellogel et agarose.

Ils comprenaient : 38 témoins,

26 formes II

8 formes III

33 formes II + IV ou IIb

45 formes IV

Peu d'auteurs, dans la littérature se sont proposés de faire une telle étude comparative ; R.P. Noble, aux Etats Unis, inventeur de la méthode sur agarose a établi une comparaison entre les lipoprotéinogrammes obtenus sur papier et sur agarose, Winkelman aux Etats Unis, F. Bertrand, Watelet, Genetet, Nabet et Paysant en France, ont comparé les résultats obtenus sur papier et sur cellogel. Les points de vue de ces différents auteurs seront envisagés dans cet ouvrage.

PLAN D'ETUDE

1 - Présentation des différentes méthodes d'électrophorèse des lipoprotéines plasmatiques.

Résultats obtenus avec chacune d'elles.

2 - Etude comparative des résultats obtenus.

3 - Intérêt pour le diagnostic clinique de chaque méthode.

4 - Point de vue de différents auteurs.

5 - Conclusion générale.

PREMIERE PARTIE

Etude descriptive des électrophorèses

a- sur papier,

b- sur agarose,

c- sur cellogel

et résultats obtenus chez des témoins, des sujets atteints de forme II , III IV et IIb de Fredrickson.

LIPOPROTEINOGRAMMES SUR PAPIER

C'est en 1963 que Lees et Hatch proposèrent la méthode de l'électrophorèse sur papier en tampon véronal albumine grâce à laquelle ils purent individualiser avec précision les lipoprotéines suivantes :

- les chylomicrons au point de départ
- les bêtalipoprotéines (ou LDL)
- les prébêtalipoprotéines (ou VLDL)
- et les alphalipoprotéines (ou HDL)

Fredrickson et Lees utilisèrent cette méthode pour donner une classification des hyperlipémies rencontrées en clinique humaine.

1/ Technique de l'électrophorèse sur papier.

Elle se fait à la température ambiante, par la méthode de la bande de papier de Wilke, dans un tampon barbital de force ionique 0,1, pH 8,6 et contenant 0,001 M EDTA et 1 % d'albumine. On peut utiliser de l'albumine humaine ou bovine.

L'électrophorèse se fait pendant 16 heures à voltage constant (120 volts) avec un courant de 0,75 à 1 milliampère par bande.

Du papier Whatman n°1 fournit les bandes les plus précises avec le degré minimum de coloration de l'arrière-plan. Les séparations optima des lipoprotéines exigent la mise en équilibre des bandes 3 à 4 heures dans la cellule fermée avant d'appliquer l'échantillon, le maintien du même niveau de tampon dans les deux parties de la cuve, et le contrôle périodique du pH du tampon. Le vieillissement du tampon est associé à une chute du pH au-dessous de 8,2.

Après électrophorèse, les bandes sont séchées au four à 95°C pendant 20 mn et colorées par immersion dans une solution alcoolique sursaturée d'Oil Red à 40°C pendant 4 à 6 heures.

Les spécimens sont alors rincés et séchés.

L'intensité de coloration des bandes est fonction de l'âge et du degré de saturation du colorant et des bandes de contrôle doivent être préparées régulièrement pour permettre la comparaison.

2/ Résultats.

1- chez les témoins

- les bêtalipoprotéines migrent en une bande étroite et très colorée,
- les alphalipoprotéines migrent davantage vers l'anode en une bande relativement large, mais bien individualisée.
- entre les alpha et les bêta, et contigüe à ces dernières, apparaît une bande représentant les prébêta.
- la majeure partie des chylomicrons de la période post-prandiale restent au point de départ.

L'étude a porté sur 38 sujets témoins. Les résultats suivants ont été retrouvés :

. dosage des lipides plasmatiques ; en g/l de sérum :

lipides totaux = 6,38 ± 0,53

cholestérol = 1,95 ± 0,16

Triglycérides = 1,09 ± 0,20

. L'électrophorèse des sérums a fourni les pourcentages suivants :

alpha = 23,8 ± 2,3

bêta = 70,6 ± 2,8

prébêta = 5,60 ± 2,82

2- Etude de sérums pathologiques

A - Sérums de type II de Fredrickson (hyperbêtalipoprotéinémie)

• La bande des alphalipoprotéines est identique à celle des sérums normaux,

• Les bêtalipoprotéines sont, par contre, en quantité plus importante

• alors que la bande des prébêta est légèrement affaiblie.

L'étude de 26 sérums de forme II a donné les résultats suivants :

• dosage des lipides plasmatiques en g/l de sérum :

lipides totaux = 9,24 ± 0,70

cholestérol = 3,03 ± 0,23

triglycérides = 1,00 ± 0,10

• pourcentage des fractions électrophorétiques :

alpha = 23,3 ± 3,3

bêta = 72,9 ± 4,3

prébêta = 3,44 ± 2,62

B - Sérums de type III

• Le pourcentage des alphalipoprotéines est diminué par rapport à celui des sérums témoins,

• L'excès lipoprotéinique est retrouvé dans les zones bêta et prébêta sous forme d'une migration "bêta large" ou "broad bêta" réalisant ainsi un profil électrophorétique caractéristique de ce type d'hyperlipidémie mixte.

L'étude de 6 sérums de forme IIIa donné les résultats suivants :

dosage des lipides plasmatiques en g/l

lipides totaux = 12,86 ± 4,04

cholestérol = 3,00 ± 0,38

triglycérides = 4,00 ± 3,30

Pourcentage des fractions électrophorétiques :

alpha = 14 ± 4,2

bêta = 78,8 ± 6,5

prébêta = broad bêta.

C - Sérums de type IV -

- Ici également, le pourcentage des alphalipoprotéines est diminué

de même que celui des bêta au profit des prébêta qui constituent une bande plus large et plus intensément colorée.

- Sur 45 sujets, atteints de forme IV, les résultats suivants ont été trouvés :

dosage des lipides plasmatiques en g/l :

lipides totaux = 10,23 ± 1,57

cholestérol = 2,33 ± 0,16

triglycérides = 3,71 ± 1,27

pourcentage des fractions électrophorétiques :

alpha = 15 ± 2,7

bêta = 68,5 ± 4,6

prébêta = 14,37 ± 4,53

D - Sérums des sujets atteints d'hyperlipidémie mixte de type IIb

- Le pourcentage des alphalipoprotéines est diminué,

- la surcharge lipidique se manifeste ici par une augmentation du pourcentage des bêta et des prébêta prenant le profil électrophorétique d'une double bande bêta et prébêta.

C'est ainsi que sur 33 sujets atteints de cette forme d'hyperlipidémie, les résultats suivants ont été trouvés :

dosage des lipides plasmatiques en g/l :

lipides totaux = 11,18 ± 0,86

cholestérol = 3,02 ± 0,20

triglycérides = 2,73 ± 0,49

pourcentages obtenus à l'électrophorèse :

alpha = 16,5 ± 2,7

bêta = 73 ± 3,9

prébêta = 9,83 ± 3,21.

3/ Conclusion

Bien que simple, cette technique ne peut être facilement utilisée en pratique de grande routine hospitalière du fait de l'encombrement de l'appareillage, de la longueur des manipulations ; c'est pourquoi, d'autres méthodes d'électrophorèse ont été mises au point.

LIPOPROTEINOGRAMMES SUR AGAROSE

Cette méthode d'électrophorèse des lipoprotéines sur support d'agarose a été mise au point par R.P. Noble en 1968. Cette technique, d'après son auteur, apporte des résultats bien supérieurs à ceux obtenus sur papier en montrant des bandes de lipoprotéines nettement individualisées. Mais son intérêt principal résulte de la séparation franche des bêta et des prébêta lipoprotéines.

1/ Méthode

- Le support de l'électrophorèse est un gel d'agarose dont la composition est la suivante :

  - poudre d'agarose,
  - tampon barbital de force ionique 0,05 M et pH 8,6,
  - poudre d'albumine bovine.

- Le mélange est mis dans une éprouvette et déposé dans un bain d'eau à 45°.

- Ce gel est appliqué à l'aide d'une pipette sur une fine bande de film photo, selon la technique de Noble ou, en ce qui nous concerne, sur une plaque de verre.

- Après séchage 50 µl de sérum sont déposés sur la ligne de départ, près du bord cathodique. Une goutte d'un marqueur coloré est posé sur la ligne de départ.

- L'électrophorèse s'effectue à une température de 25°C sous un courant constant de 10 m.A. On arrête celle-ci au bout de 2 heures ou quand la migration du marqueur est de 7 cm.

- Après électrophorèse, les bandes sont fixées par immersion dans une solution d'acide acétique à 5% et d'éthanol pendant 30 mn, puis séchées à 60 - 65°C pendant 24 heures.

- Les bandes sont ensuite colorées à l'Oil Red O (2 heures).

Elles sont enfin placées dans l'intégraph qui donne automatiquement la courbe de la densité optique.

Il faut veiller à ce que le gel ne se déshydrate pas à la température de la pièce.

2/ Résultats

1- chez les témoins

De l'anode vers la cathode, sont individualisées :

- une bande d'alphalipoprotéines bien nette,
- une bande de prébêta nettement visible même chez les témoins,
- une bande de bêta nettement définie.

R.P. Noble insiste sur cette séparation franche des bêta et des prébêta qui, selon lui, apporte une amélioration importante par rapport à la méthode sur papier. L'intégraph fait d'ailleurs apparaître deux pics bien séparés.

- les chylomicrons, que l'on retrouve dans le plasma, après un repas très gras, restent à l'origine.

L'étude de 38 sérums témoins a donné les résultats suivants :

. dosage des lipides plasmatiques en g/I

lipides totaux = 6,38 $\pm$ 0,53

cholestérol = 1,95 $\pm$ 0,16

triglycérides = 1,09 $\pm$ 0,20

. pourcentage des fractions électrophorétiques

alpha = 21,7 $\pm$ 2,4

bêta = 59,9 $\pm$ 4

prébêta = 18,38 $\pm$ 3,27

2- Etude de sérums pathologiques.

A - Sérums de forme II

- la bande des alphalipoprotéines est légèrement majorée par rapport à celle des sérums témoins,

- la bande des bêta est majorée, confirmant l'hyperbêtalipoprotéinémie,

- la bande des prébêta est séparée franchement de celle des bêta ; cette bande prébêta est affaiblie par rapport aux témoins.

L'étude de 26 sérums de forme II a fourni les résultats suivants :

. dosage des lipides plasmatiques en g/l

lipides totaux	= 9,24	± 0,70
cholestérol	= 3,03	± 0,23
triglycérides	= 1,00	± 0,10

. Résultats de l'électrophorèse en %

alpha	= 23,1	± 2,5
bêta	= 63,7	± 2,8
prébêta	= 13,65	± 2,72

B - Sérums de type III

- la bande des alphalipoprotéines est affaiblie par rapport à celle des témoins

- les régions des bêta et des prébêta sont colorées plus intensément que la partie qui les sépare ; l'intégrateur marque un pic à chaque fin de plateau.

L'aspect "broad bêta" n'est pas toujours retrouvé.

Par ailleurs, la région des prébêta est plus intensément colorée que celle des bêta.

Les 8 sérums de forme III étudiés ont fourni les résultats suivants :

. Dosage des lipides plasmatiques en g/l

lipides totaux = 12,86 ± 4,04

cholestérol = 3,00 ± 0,38

triglycérides = 4,00 ± 3,30

. Résultats de l'électrophorèse en %

alpha = 14,6 ± 6,3

bêta = 47,3 ± 15,3

prébêta = 33,5 ± 15,4

C - Sérums de forme IV

- la bande des alpha est affaiblie par rapport à celle des témoins,
- la bande des bêta l'est également,
- la bande des prébêta est plus large et colorée, parfois plus intensément que celle des bêta.

L'étude de 45 sérums de forme IV a fourni les résultats suivants :

. Dosage des lipides plasmatiques en g/l

lipides totaux = 10,23 ± 1,57

cholestérol = 2,33 ± 0,16

triglycérides = 3,71 ± 1,27

. Résultats de l'électrophorèse en %

alpha = 15,3 ± 2,6

bêta = 48,1 ± 4,8

prébêta = 35,33 ± 4,55

D - Sérums de type II b

- là encore, la bande des alpha est affaiblie
- de même que celle des bêta
- par contre, la bande des prébêta est nettement majorée.

En effet, les 33 sérums examinés ont révélé les résultats suivants :

. Dosage des lipides plasmatiques en g/l

lipides totaux = 11,18 ± 0,86

cholestérol = 3,02 ± 0,20

triglycérides = 2,73 ± 0,49

. Pourcentages électrophorétiques :

alpha = 13,6 ± 1,8

bêta = 52,6 ± 3,7

prébêta = 33,19 ± 4,27

3/ Conclusion

Les électrophorégrammes obtenus sur gel d'agarose sont de meilleure qualité que ceux obtenus sur papier dans la mesure où

- l'adsorption des protéines sur le support est réduite,
- les zones de lipoprotéines sont mieux définies,
- la séparation des bêta et des prébêta est meilleure.

Chez les témoins, l'intégrateur fait apparaître un pourcentage de prébêta nettement plus important que sur papier.

Dans les formes II, les bêtalipoprotéines sont majorées

Dans les formes III, le plus souvent, n'est pas retrouvée une bande large et homogène occupant les positions des bêta et des prébêta, mais une bande où les régions des bêta et des prébêta sont colorées plus intensément que la partie qui les sépare.

Dans les formes IIb enfin le pourcentage de prébêta individualisé est tel que le taux de bêta identifié dans ces formes est plus faible que celui des témoins.

LIPOPROTEINOGRAMMES SUR CELLOGEL

Il s'agit d'une microméthode effectuée sur acétate de cellulose gélatineux ; ce support permet une bonne séparation des lipoprotéines et tolère des techniques simples de séparation, permettant d'effectuer des lipoprotéinogrammes en grande routine.

1/ Méthode selon F. Bertrand, M. Watelet, F. Genetet , P. Nabet et P. Paysant.

- l'électrophorèse se pratique dans une cuve de l'appareillage Microzone Beckman.

- le support consiste en des membranes d'acétate de cellulose gélatineux (cellogel) spécialement destinées au système microzone et permettant la migration simultanée de 8 sérums.

- le tampon véronal de Michaelis a une force ionique de 0,075 M et un pH de 8,6.

- la membrane est imprégnée de tampon pendant 10 mn puis essorée dans du papier filtre. Les dépôts de 1,25 µl de sérums sont effectués sur la face mate de la membrane, à 4 cm du bord cathodique avec l'applicateur prévu à cet usage.

- la migration se fait sous 250 volts pendant 20 mn.

- la fixation est réalisée par passage dans une solution d'acide acétique à 2,5 % pendant 10 mn.

- la membrane est immergée pendant 2 heures dans une solution colorante la solution alcoolique de rouge Ciba, solution à préparer le jour même.

- on rince la membrane à l'eau courante ; le fond reste parfaitement blanc.

Ainsi réalisés, les lipoprotéinogrammes permettent un enregistrement dont les simples données qualitatives fournissent un document à la clinique.

2/ Résultats

1- Etude des 38 sérums témoins.

- des préalphalipoprotéines apparaissent nettement,
- les alphalipoprotéines sont bien visibles,
- les prébêtalipoprotéines forment une bande séparée de celle des bêta dont la migration est plus lente.

Chez ces 38 témoins, les résultats suivants ont été trouvés :

. dosage des lipides plasmatiques en g/l

lipides totaux = 6,38 ± 0,53

cholestérol = 1,95 ± 0,16

triglycérides = 1,09 ± 0,20

. Pourcentage des différentes fractions à l'électrophorèse

alpha = 31 ± 3,00

bêta = 61 ± 2,9

prébêta = 7,7 ± 3,3

2- Etude de sérums pathologiques.

A - Sérums de forme II (26 cas)

. dosage des lipides plasmatiques

lipides totaux = 9,24 ± 0,70

cholestérol = 3,03 ± 0,23

triglycérides = 1,00 ± 0,10 en g/l

. l'électrophorèse de ces sérums a fourni les pourcentages suivants

alpha = 29 ± 3,6

bêta = 65 ± 4,2

prébêta = 6 ± 2,7

confirmant l'hyperbêtalipoprotéinémie de ces formes telle que l'avait proposé Frédrickson.

B - Sérums de forme III (8 cas)

. dosage des lipides plasmatiques

lipides totaux = 12,86 ± 4,06

cholestérol = 3,00 ± 0,38

triglycérides = 4,00 ± 3,30 g/l

. l'électrophorèse a fourni les résultats suivants :

- un pourcentage d'alphalipoprotéines nettement diminué par rapport à celui des sérums témoins,
- des bêtalipoprotéines à un taux supérieur à celui des témoins ainsi que
- des prébêta élevés confirmant le diagnostic d'hyperlipidémie mixte

De même que sur agarose, on ne retrouve pas ici le plus souvent une bande homogène occupant les positions des bêta et des prébêta, mais une bande où les régions des bêta et des prébêta sont colorées plus intensément que la région qui les sépare, permettant l'appréciation quantitative de ces fractions lipoprotéiniqu

Les pourcentages suivants ont été obtenus :

alpha = 15 ± 6,4

bêta = 73,3 ± 11

prébêta = 9,7 ± 8,4

C - Sérums de forme IV

L'étude de 45 sérums a fourni les résultats suivants quant au dosage des lipides plasmatiques en g/l

lipides totaux = 10,23 ± 1,57

cholestérol = 2,33 ± 0,16

triglycérides = 3,71 ± 1,27

. l'électrophorèse a révélé l'aspect suivant :

- une bande d'alphalipoprotéines affaiblie
- ainsi que celle des bêta ; au contraire de la bande prébêta qui, elle, est majorée.

Les pourcentages suivants ont été obtenus :

alpha = 20 ± 2,6

bêta = 51,9 ± 4,8

prébêta = 28,1 ± 5,4

confirmant l'hyperbêtalipoprotéinémie de tels sujets

D - Sérums de forme mixte II b

Les 33 sérums examinés ont fourni les résultats suivants :

. dosage des lipides plasmatiques en g/l

lipides totaux = 11,18 ± 0,86

cholestérol = 3,02 ± 0,20

triglycérides = 2,73 ± 0,49

. l'électrophorèse a fourni les résultats suivants :

- par rapport aux sérums témoins, une baisse du pourcentage des alphalipoprotéines, baisse également du taux des bêta, alors que seules les prébêta sont majorées.

Ainsi, l'électrophorèse sur cellogel ne rend pas compte du caractère mixte de cette hyperlipidémie.

pourcentage des différentes fractions :

alpha = 20,3 ± 2,2

bêta = 58,1 ± 4,3

prébêta = 21,2 ± 5,3

3/ Conclusion

L'intérêt de la méthode proposée repose sur la rapidité du temps électrophorétique, la simplicité de la coloration, la séparation très satisfaisante et reproductible des fractions lipoprotéiques.

Chez les sujets normaux, moins de bêta mais légèrement plus de prébêta sont individualisées que sur papier.

Dans les formes II, on note une majoration nette des bêta,

Dans les formes III, est retrouvée une bande non homogène de bêta et de prébêta,

Dans les formes IV, l'hyperprébêta est manifeste,

Dans les formes II b, les prébêta sont majorées. Mais nous ferons ici la même remarque que pour l'agarose, le pourcentage des bêta individualisé est inférieur à celui d'un sujet normal.

	TEMOINS 38 cas	FORME II 26 cas	FORME III 8 cas	FORME IV 45 cas	TYPE II + IV 33 cas
LIPIDES TOTAUX gr/oo	6,38 ± 0,53	9,24 ± 0,70	12,86 ± 4,04	10,23 ± 1,57	11,18 ± 0,86
CHOLESTEROL gr/oo	1,95 ± 0,16	3,03 ± 0,23	3,00 ± 0,38	2,33 ± 0,16	3,02 ± 0,20
TRIGLYCERIDES gr/oo	1,09 ± 0,20	1,00 ± 0,10	4,00 ± 3,30	3,71 ± 1,27	2,73 ± 0,49
ALPHA PAPIER %	23,8 ± 2,3	23,3 ± 3,3	14 ± 4,2	15 ± 2,7	16,5 ± 2,7
ALPHA CELLOGEL %	31 ± 3,00	29 ± 3,6	15,0 ± 6,4	20 ± 2,6	20,3 ± 2,2
ALPHA AGAROSE %	21,7 ± 2,4	23,1 ± 2,5	14,6 ± 6,3	15,3 ± 2,6	15,6 ± 1,8
BETA PAPIER %	7 0,6 ± 2,8	72,9 ± 4,3	78,8 ± 6,5	67,5 ± 4,6	73 ± 3,9
BETA CELLOGEL %	61 ± 2,9	65 ± 4,2	73,3 ± 11	51,9 ± 4,8	58,1 ± 4,3
BETA AGAROSE %	59,9 ± 4	63,7 ± 2,8	47,3 ± 15,3	48,1 ± 4,8	52,6 ± 3,7
PB PAPIER %	5,60 ± 2,82	3,44 ± 2,62	broad beta	14,37 ± 4,53	9,83 ± 3,21
PB CELLOGEL %	7,7 ± 3,3	6 ± 2,7	9,7 ± 8,4	28,1 ± 5,4	21,2 ± 3,3
PB AGAROSE %	13,38 ± 3,27	13,65 ± 2,72	33,5 ± 15,4	35,33 ± 4,55	33,19 ± 4,27

DEUXIEME PARTIE

Dans cette partie de notre étude, nous nous proposons de comparer les résultats que nous venons de mentionner.

1 - Sont-ils significativement différents ou non ?

2 - Certaines fractions lipoprotéiniques sont-elles mieux selectionnées par certaines méthodes que par d'autres ?

3 - Trouve-t'on des résultats semblables pour certains types d'hyperlipidémie et non pour d'autres ?

METHODE D'ETUDE

Nous avons étudié deux à deux les résultats obtenus précédemment.

La comparaison de 2 moyennes est obtenue par la formule :

$$t = \frac{m A - m B}{\sqrt{\frac{S A^2}{n A} + \frac{S B^2}{n B}}}$$

- m A et m B désignent les deux moyennes à observer
- $S A^2$ et $S B^2$ les deux variances,
- n A et n B le nombre de cas respectifs dans les deux séries.
- t est de coefficient de signification.

PAPIER - AGAROSE

	TEMOIN	FORME II	FORME II + IV	FORME III	FORME IV
lpha	1,23 NS	0,09 NS	1,73 NS	0,23 NS	0,183 NS
rébêta	5,78 S	5,64 S	8,58 S	———	6,55 S
êta	4,21 S	3,70 S	7,29 S	5,22 S	5,68 S

Comparaison entre deux méthodes

avec coefficient de signification

S = Méthodes significativement différente

NS = Méthodes non significativement différentes.

CELLOGEL - PAPIER

	TEMOIN	FORME II	FORME II + IV	FORME III	FORME IV
Alpha	3,83 S	2,48 S	2,12 S	0,31 NS	2,26 S
Prébêta	0,99 NS	0,77 NS	3,70 S	———	3,91 S
bêta	4,69 S	2,74 S	5,09 S	1,02 NS	4,61 S

Comparaison entre deux méthodes d'électrophorèses avec coefficient de signification.

S = Méthodes significativement différentes

NS = Méthodes non significativement différentes.

AGAROSE - CELLOGEL

	TEMOIN	FORME II	FORME II + IV	FORME III	FORME IV
Alpha	5,70 S	2,80 S	4,64 S	0,09 NS	2,40 S
Prébêta	4,61 S	4,20 S	3,53 S	3,53 S	2,00 S
bêta	0,39 NS	0,81 NS	1,95 NS	3,51 S	1,08 NS

Comparaison entre deux méthodes
avec coefficient de signification

S = Méthodes significativement différentes

NS = Méthodes non significativement différentes

INTERPRETATION DES TABLEAUX

I - En ce qui concerne l'étude des alphalipoprotéines

- l'électrophorèse sur papier et l'électrophorèse sur agarose fournissent des résultats sensiblement analogues.

- Par contre, les lipidogrammes sur cellogel donnent les taux d'alphalipoprotéines les plus élevés et significativement différents de ceux obtenus par les autres méthodes, exception faite des formes III.

En conclusion, les alphalipoprotéines sont majorées par l'électrophorèse sur cellogel.

II - Etude des prébêtalipoprotéines

- L'électrophorèse sur agarose donne les taux de prébêta les plus élevés, différents significativement de ceux obtenus sur papier ou sur cellogel.

- Les lipidogrammes sur papier et sur cellogel fournissent des résultats analogues dans les formes II et chez les témoins. Par contre, les méthodes sont significativement différentes dans les autres cas.

- les lipidogrammes sur papier apportent toujours les taux de prébêta les plus bas. En outre, le taux ne peut être fourni dans les formes III.

En conclusion, les prébêtalipoprotéines sont majorées par la méthode sur cellogel et plus encore par la méthode sur agarose.

III - Etude des bêtalipoprotéines

- Les lipidogrammes sur papier fournissent les taux de bêta les plus élevés et différents de façon significative de ceux dénombrés sur agarose ou sur cellogel, exception faite des formes III sur cellogel.

- L'étude des bêtalipoprotéines sur cellogel ou agarose est sensiblement identique, sauf pour les formes III où les deux méthodes diffèrent significativement.

En conclusion, les bêtalipoprotéines sont majorées par l'électrophorèse sur papier

Maintenant, nous allons comparer deux à deux chaque type d'électrophorèse étudiée :

- papier et cellogel,
- papier et agarose,
- cellogel et agarose.

I - Papier et Cellogel

a) les renseignements fournis par les lipoprotéinogrammes sur papier et sur cellogel, concernant les alphalipoprotéines, ne sont pas superposables. En effet, à l'exception des formes III, dans tous les autres cas les deux méthodes diffèrent de façon significative.

b) en ce qui concerne les prébêta, les deux méthodes sont significativement différentes dans les formes II b, III et IV.

c) l'étude des bêtalipoprotéines enfin n'a pas donné de résultats superposables dans la majorité des cas, une différence non significative entre les deux méthodes n'étant retrouvée que dans les formes III.

II - Papier et Agarose

a) Les deux méthodes fournissent des résultats analogues en ce qui concerne l'étude des alpha lipoprotéines.

b) par contre, les deux méthodes diffèrent, de façon significative, quand il s'agit de mesurer les proportions de bêta et de prébêtalipoprotéines dans un sérum humain, qu'il soit normal ou pathologique.

Les taux de bêtalipoprotéines dosés sur papier sont beaucoup plus élevés que ceux retrouvés sur agarose.

Et inversement, les taux de prébêta sur agarose sont supérieurs à ceux mesurés sur papier.

III - Cellogel et Agarose

a) Ces deux méthodes ne fournissent pas de résultats superposables en ce qui concerne l'étude des alphalipoprotéines puisque les résultats diffèrent de façon significative dans tous les cas à l'exception des formes III.

c) L'étude des bêtalipoprotéines fournit des résultats sensiblement analogues, une différence significative entre les deux méthodes n'étant retrouvée que dans les formes III.

d) Enfin, les deux méthodes sont significativement différentes pour toutes les formes d'hyperlipidémie en ce qui concerne l'approche des prébêta-lipoprotéines.

CONCLUSION DE LA DEUXIEME PARTIE

Ainsi réalisés, les lipoprotéinogrammes permettent un enregistrement dont les simples données qualitatives fournissent un document à la clinique.

De ces expériences, il résulte que les sérums normaux et pathologiques ont bien le même comportement dans les trois systèmes d'électrophorèse auxquels ils ont été soumis. Les migrations électrophorétiques sont identiques ; les différentes bandes de migration étant constituées par des alpha, prébêta et bêtalipoprotéines.

Mais il ressort de cette étude que l'on ne peut utiliser indifféremment l'une ou l'autre méthode pour suivre l'évolution d'un malade atteint d'hyperlipidémie.

En effet, nous avons vu que les alphalipoprotéines sont majorées par l'électrophorèse sur cellogel et qu'un taux de 31 % sur papier ou sur agarose serait anormal alors qu'il ne l'est pas sur cellogel.

Mais, ce qui nous intéresse surtout ici, c'est l'étude des bêta et des prébêtalipoprotéines puisque c'est sur elle que repose essentiellement la classification de Fredrickson.

Nous avons pu noter une majoration des bêtalipoprotéines sur l'électrophorèse sur papier et ce aux dépens des prébêta qui, elles,sont majorées sur cellogel et plus encore sur agarose.

En effet, chez les témoins, en gel d'agarose, le pourcentage des prébêta atteint 18 % alors qu'il est de 5 à 8 % pour les autres méthodes.

Donc, la méthode sur agarose, qui est la plus longue et la plus minutieuse, majore les prébêta par rapport aux bêta. Elle individualise en somme plus de prébêta que les autres méthodes. Si son pouvoir de séparation est meilleur, elle doit par contre être interprétée différemment ; avec cette méthode, un taux de 18 % de prébêta n'est pas pathologique et se rencontre chez des sujets normaux.

TROISIEME PARTIE

Après avoir étudié les qualités respectives de chaque méthode, nous allons essayer de savoir si l'une est supérieure à l'autre pour le diagnostic et si la classification de Fredrickson, établie d'après la méthode sur papier, peut facilement s'appliquer au cellogel ou à l'agarose.

En effet, maintenant que nous avons étudié les trois méthodes d'électrophorèse les plus utilisées actuellement, que nous avons souligné la divergence des résultats obtenus, essayons de savoir si, finalement, les améliorations techniques facilitent le classement clinique et c'est ce qui est le plus important car il s'ensuit des déductions sur le plan pronostic, diététique et thérapeutique différentes.

La plus intéressante et la plus célèbre classification est sans aucun doute celle que proposa Fredrickson en 1965, fondée sur les différents aspects électrophorétiques obtenus sur papier.

Nous en rappelons brièvement les éléments :

type I = présence de chylomicrons,

type II = augmentation de l'intensité de coloration de la bande des bêtalipoprotéines,

type III = broad bêtalipoprotéine = bande anormalement large de bêta lipoprotéines ou bloc bêta prébêta.

type IV = présence importante de prébêtalipoprotéines

type V = association de chylomicrons et de prébêta en quantité importante.

Une première modification a été apportée l'année suivante en 1966 à cette classification : la "broad bêta" serait pour certains auteurs une lipoprotéine anormale puisque, associant une mobilité électrophorétique de type bêtalipoprotéine à une densité de flottation de type prébêta. Pour d'autres auteurs, il s'agit d'une bêtalipoprotéine surlipidée.

Une deuxième modification a été apportée en 1970 ; (classification de Beaumont Carlson Fredrickson et coll.) les auteurs s'étaient aperçus qu'un grand nombre d'hypercholestérolémies avec hypertriglycéridémie d'accompagnement

répondait en électrophorèse à une augmentation de la bande des bêta associée à une bande de prébêta et ne correspondait à aucun type électrophorétique jusque là individualisé ; c'est ce qu'on a appelé le type II + IV ou II b.

C'est cette classification que nous allons maintenant être appelés à discuter.

1/ En ce qui concerne l'étude des formes II (qui correspondent à l'augmentation isolée des bêtalipoprotéines avec parfois présence de prébêta en quantité peu importante) nous avons obtenu des résultats compatibles avec la classification. Ce n'est donc pas sur ces formes II, formes dans lesquelles se rangent les hypercholestérolémies isolées, que se portera la discussion.

2/ Par contre, les lipoprotéinogrammes des formes III (caractérisés par une bande lipoprotéique large occupant les positions normales des bêta et des prébêta) se présentent différemment

sur papier est figurée une bande large et homogène

alors que sur cellogel et sur agarose, existe le plus souvent une bande non homogène ; les bandes des bêta et des prébêta étant séparées imparfaitement par une partie plus claire.

D'autre part, les résultats fournis par le cellogel et par l'agarose ne vont pas dans le même sens.

En effet, les bêtalipoprotéines sont augmentées sur cellogel alors qu'elles sont diminuées sur agarose. Et inversement, les prébêtalipoprotéines sont faiblement élevées sur cellogel alors qu'elles le sont, de façon importante, sur agarose, atteignant un taux de 33,5%, taux voisin des formes IV et II b.

L'on conçoit aisément, que si l'on s'en tient strictement à la classification de Fredrickson, le diagnostic électrophorétique de ces formes, qui regroupent un certain nombre d'hypertriglycéridémies mixtes, soit rendu difficile

sur cellogel et plus encore sur agarose puisque l'aspect ainsi réalisé, d'après Fredrickson, pourrait être celui d'une forme IV.

3/ Les lipoprotéinogrammes des formes IV (correspondant à l'augmentation isolée des prébêtalipoprotéines) nous montrent sur les trois types d'électrophorèse :

une baisse des alphalipoprotéines,

une baisse des bêtalipoprotéines nette sur cellogel et agarose,

une majoration des prébêtalipoprotéines qui est nette sur papier, qui, sur cellogel atteint un taux nettement plus élevé que dans les formes III puisque le pourcentage passe de 9 à 28 % ; sur agarose, les prébêta sont nettement supérieures aux taux des sujets témoins ; par contre, ce pourcentage est peu différent de celui retrouvé dans les formes III ; 35 % dans les formes IV et 33 % dans les formes III.

On peut conclure que les résultats obtenus sont pour le type IV conformes à la classification de Frédrickson.

4/ L'interprétation des lipidogrammes des formes II b (caractérisés par un excès de cholestérol et une légère augmentation des triglycérides) aboutit aux constatations suivantes :

les alphalipoprotéines sont diminuées dans tous les cas,

le pourcentage des bêtalipoprotéines n'est supérieur à celui des témoins, sur papier uniquement ; sur cellogel et plus encore sur agarose, le taux obtenu est plus faible que celui des témoins ;
sur cellogel, le taux de bêta (58 %) est donc inférieur à celui des témoins (61 %) , des formes II (65 %), des formes III (73 %) ; mais reste cependant nettement supérieur à celui des formes IV (51 %) permettant de différencier ces deux formes.

Sur agarose, le taux de bêta obtenu (52 %) est inférieur à celui des témoins (59 %), des formes II (63 %) mais reste supérieur à celui des formes III (47 %) et des formes IV (48 %) permettant tout de même la différenciation avec cette dernière forme.

Quant aux prébêta, elles sont modérément majorées sur papier, davantage sur cellogel et sur agarose où elles atteignent un taux de 33 % voisin de celui retrouvé dans les formes IV (35 %) et dans les formes III (33 %).

Si l'on applique strictement ici la grille que propose Fredrickson en vue de la classification des hyperlipidémies, le diagnostic électrophorétique de ces formes est celui d'une forme IV. Mais, une comparaison minutieuse permet cependant de distinguer ces deux types.

- Sur cellogel, les taux de prébêta, bien que majorés, sont cependant différents, nettement supérieurs dans les formes IV. Et les taux de bêta, bien qu'inférieurs à ceux des témoins, sont toutefois nettement supérieurs dans les formes II b .

Ces variations en sens inverse des bêta et des prébêta permettent encore de distinguer les formes II b et IV.

- Sur agarose, les variations sont moins nettes mais elles vont dans le même sens puisque le taux de prébêta passe de 35 % dans les formes IV à 33 % dans les formes II b et que celui des bêta passe de 48 % à 52 % dans les formes II b. C'est donc surtout la majoration des bêta qui permet de séparer ces deux formes.

CONCLUSION

Si la classification proposée par Frédrickson est commode pour classer les lipidogrammes de tous types obtenus sur papier, elle ne peut plus s'appliquer strictement aux lipidogrammes appartenant au cadre des hypertriglycéridémies mixtes.

Dans les formes III, n'est plus figurée une bande anormalement large et homogène occupant les positions des bêta et des prébêtalipoprotéines mais deux bandes de bêta et de prébêta séparées par une zone plus claire, avec majoration de la bande des bêta sur cellogel, phénomène en contradiction avec ce que l'on observe sur agarose où c'est la bande des prébêta qui est majorée.

Dans les formes II b, les taux de bêtalipoprotéines sont inférieurs à ceux des témoins, ne permettant plus de poser le diagnostic d'hyperlipidémie mixte au sens où l'avait établi Fredrickson.

QUATRIEME PARTIE

Dans ce chapitre, nous allons étudier le point de vue de différents auteurs :

Noble qui a établi une comparaison entre le papier et l'agarose,

Winkelman,

Bertrand, Watelet, Genetet, Nabet et Paysant qui ont comparé le papier et le cellogel.

Noble, lors de la présentation de sa méthode d'électrophorèse des lipoprotéines plasmatiques sur agarose, a établi une comparaison entre les résultats obtenus sur papier et ceux fournis par l'agarose.

Cette étude a donné lieu aux conclusions suivantes :

- chez les sujets normaux, une bande de prébêta est nettement plus marquée sur agarose,

- type II, il apparaît une bande de bêta nettement plus intense sur agarose,

- type III, dans deux cas sur quatre, sont visualisées deux bandes séparées de bêta et de prébêta ; ailleurs, aspect de "broad bêta".

- type IV, il apparaît une bande de prébêta colorée plus intensément que sur papier.

Selon Noble, les résultats obtenus sur agarose sont supérieurs à ceux obtenus sur papier ; le principal avantage étant la nette séparation des bêta et des prébêtalipoprotéines.

Mais, Noble, dans cette étude, ne nous fournit pas les pourcentages des bêta et des prébêta qu'il a enregistrés dans les formes III et IV qui nous intéressent plus particulièrement ici et le problème des formes II bn'est pas abordé.

Winkelman, aux Etats-Unis, a réalisé des lipoprotéinogrammes sur papier et sur cellogel et établi une comparaison et ce d'après l'étude de sérums de sujets normaux et de sujets atteints de forme I-II-III-IV-et V.

D'après cette étude, le cellogel fournit des résultats plus exacts et plus fiables que le papier mais en accord avec celui-ci cependant.

Dans les formes II, davantage de prébêta sont individualisées sur cellogel que sur papier.

Dans les formes III, tantôt est visualisée une seule bande, la broad bêtalipoprotéine, tantôt sont mises en évidence deux bandes totalement séparées de bêta et de prébêtalipoprotéines.

On peut regretter que le problème des formes II b , qui pour nous est de diagnostic électrophorétique difficile, ne soit pas abordé ici.

En France, F. Bertrand, M. Watelet, F. Genetet, P. Nabet et P. Paysant présentent sur cellogel quelques diagrammes pathologiques caractéristiques des formes II - III - IV et V.

Ils montrent la similitude des migrations électrophorétiques dans la technique proposée (sur acétate de cellulose gélatineux) et dans le système classique Lees et Hatch (électrophorèse sur papier en tampon véronal albumine).

La même remarque que précédemment peut être formulée : celle de n'avoir pas abordé, au cours de cette étude, le problème des formes II b.

CONCLUSION GENERALE

L'électrophorèse sur papier, malgré le faible pouvoir de séparation qui lui est reproché, permet aisément de classer les hyperlipidémies rencontrées en clinique humaine et partant, d'en déduire le traitement, voire le pronostic propre à chaque forme de la classification.

L'électrophorèse sur cellogel apporte une meilleure limitation des zones de lipoprotéines et un meilleur isolement des alphalipoprotéines. Elle permet facilement de classer les formes II et les formes IV.

Mais, dans les formes III, l'aspect n'est pas le plus souvent celui de la "broad bêtalipoprotéine" puisqu'une bande de prébêta peut y être individualisée.

Dans les formes IIb ; les taux de bétaliprprotéines restent inférieurs à ceux des sujets normaux ne permettant pas de poser le diagnostic d'hypertriglycéridémie mixte au sens de la classification actuelle.

L'électrophorèse sur agarose individualise au mieux les prébêtalipoprotéines et apporte une nette séparation des bêta et des prébêtalipoprotéines.

Cette majoration est manifeste chez les témoins où elle isole un taux de prébêta supérieur au double du pourcentage obtenu sur papier où sur cellogel.

Le diagnostic des formes II, entenant compte de cette majoration, est facile de même que celui des formes IV.

Par contre, n'est pas observée une "broad bêtalipoprotéine" dans les formes III, mais une bande allant des bêta aux prébêta dans laquelle les prébêta sont fortement majorées.

Enfin, de même que sur cellogel, dans les formes IIb, le taux de bêta isolé est inférieur à celui des témoins.

L'étude des lipoprotéinogrammes obtenus sur cellogel et plus encore sur agarose nous conduit à réenvisager le problème des hypertriglycéridémies mixtes et de leur classification en fonction de ces nouvelles données.

C'est probablement grâce à des études plus rigoureuses sur le plan génétique, enzymatique et diététique qu'on pourra à l'avenir tenter de démembrer ce syndrome complexe des hypertriglycéridémies.

BIBLIOGRAPHIE

I - J.F. BERTRAND, M. WATELET, F. GENETET, P. NABET, P. PAYSANT
Annales de biologie clinique 1969, 27, 10-12, 735, 747
lipoprotéinogrammes sur acétate de cellulose gélatineux - Microméthode.

II - J.P. BOUCHON
thèse de Paris 1964
Révision analytique et critique de 60 cas de syndromes hyperlipidémiques.

III - D.S. FREDRICKSON, R.S. LEES
Circulation, 1965, 31, 321
A system for phenotyping hyperlipoproteinemia.

IV - D.S. FREDRICKSON
Ann. Int. Med 1971, 75, 471
An international classification of hyperlipidemias and hyperlipoproteinemias.

V - D.S. FREDRICKSON, R.I. LEVY, R.S. LEES
New England. J. Med. 1967
An integrated approach to mechanisms and disorders.

VI - J.L. De GENNES, J.P. BOUCHON, P. GODEAU, C. RETOUR, J.P. CAMUS, R. LEVY, F. SIGUIES.
Semaine des Hôpitaux 1965, 263, 279
Confrontation aux conceptions classiques de 14 cas personnels d'hyperlipidémie.

VII - J. L. De GENNES,
Symposium d'Evian, la Baule 1969
Aspects biologiques des hyperlipidémies athérogènes
Athérome et troubles des lipides.

VIII - J.L. DE GENNES

Annales de Médecine Interne, 1971, 559-562

Objections à l'opposition du type III et II + IV sur critères purement électrophorétiques et à la réelle utilité du démembrement des hyperlipidémies mixtes.

IX - J.L. DE GENNES

La Presse Médicale, 1971, 791-795

Les hyperlipidémies idiopathiques. Proposition d'une classification simplifiée.

X - B.GUY GRAND, J. DUCHIER, G. DORF et H. BOUR

Revue du Praticien, 1970 tome XX 807-811

classification des hyperlipidémies.

XI - A. LEMAIRE

La Presse Médicale, 1971 tome 79, 789-790

classification des hyperlipidémies - Etude critique - (Editorial)

XII - R.S. LEES , F.T. HATCH

J. Lab. Clin. Med U.S.A. 1963 tome 61, 518

Sharper separation of lipoprotein species by paper electrophoresis in albumin-containing buffer.

XIII - R.I. LEVY, R.S. LEES, D.S. FREDRICKSON

J. Clin. Invest., U.S.A., 1966, 45, 63

The nature of prebeta lipoproteins.

XIV - J. LOEPER, J. ROUFFY, Melle J. LOEPER

Le Progrès Médical, 1970 tome 98, 323-327

Conception actuelle des hyperlipidémies mixtes

XV - J.LOEPER, J. ROUFFY, Melle J. LOEPER, Melle A. MOURET, Melle J. Le DOUARON

Annales de Médecine Interne, 1971, 551-557

Contribution à l'étude clinique des hyperlipicémies mixtes.

XVI - J. LOEPER, R. TRICOT, Melle J. LOEPER, J. ROUFFY

La Presse Médicale, 1969 tome 77, 171.

Valeur du lipidogramme (technique de Lees et Hatch) joint au dosage des fractions lipidiques du sérum pour le dépistage et la classification des hyperlipoprotéinémies.

XVII - A. MICHAUX, J. ROUFFY, J. LOEPER et C. DREUX

Annales de biologie clinique 1973, 95

Caractérisation des hyperlipoprotéinémies, prébêta par trois méthodes d'électrophorèse.

XVIII - R.P. NOBLE

Journal of lipid research, 1968, 693-699

Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gel.

XIX - C. PRIES, C.H. VAN GENT, H.BAES, M.K. POLANO, A. QUERIDO,

H.A.M. HULSMAN,

Clin. Chim. Acta 1968, 19, 181

The clinico chemical classification of the most common types.

XX - J. WINKELMAN, F.A. IBBOTT, C. SOBEL, D.R. WYBENGA

Clin. Chim. Acta, 1969, 26, 33

Studies of the phenotyping of hyperlipoproteinemias

Evaluation of cellulose acetate technique and comparison with paper electrophoresis.

Vu :

Le Président

J. LOEPER

Vu :

Pour le Président de l'Université

P. et M. CURIE (Paris VI) et par

autorisation

Le Vice-Président

P. BERTHAUX

Vu :

Le Directeur de l'U.E.R.

P. CASTAIGNE